



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, C12N 5/10</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/24569</p> <p>(43) 国際公開日 1999年5月20日(20.05.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05047</p> <p>(22) 国際出願日 1998年11月10日(10.11.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/307749 1997年11月11日(11.11.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 小野薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒541-8526 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 福島大吉(FUKUSHIMA, Daikichi)(JP/JP) 中出真嗣(NAKADE, Shinji)(JP/JP) 芳賀久典(HAGA, Hisanori)(JP/JP) 〒618-8585 大阪府三島郡島本町桜井3丁目1番1号 小野薬品工業株式会社 水無瀬総合研究所内 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 大家邦久, 外(OHIE, Kunihiisa et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: HUMAN LYSOPHOSPHATIDIC ACID RECEPTOR AND USE THEREOF</p> <p>(54)発明の名称 ヒトリソホスファチジン酸受容体物質およびその用途</p> <p>(57) Abstract (1) Human lysophosphatidic acid (human LPA) receptor, (2) methods for screening antagonists or agonists by using human LPA receptor protein, (3) an LPA inhibitor containing the human LPA receptor, (4) processes for producing the human LPA receptor, (5) mono- or polyclonal antibodies of the human LPA receptor, (6) cDNA encoding the human LPA receptor, (7) replication or expression vector comprising the cDNA, and (8) host cells transformed by the replication or expression vector.</p>		

(57)要約

(1)ヒトリゾホスファチジン酸 (ヒトLPA)受容体、(2)ヒトLPA受容体蛋白質を用いる拮抗剤または作動薬のスクリーニング方法、(3)ヒトLPA受容体を含有するLPA阻害剤、(4)ヒトLPA受容体の製造方法、(5)ヒトLPA受容体のモノまたはポリクローナル抗体、(6)ヒトLPA受容体をコードするcDNA、(7)前記cDNAからなる複製または発現ベクター、および(8)前記複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	ML モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MN モンゴリア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MR モリタニア	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MW マラウイ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	MX メキシコ	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NE ニジェール	ZA 南アフリカ共和国
CN 中国	IT イタリア	NL オランダ	ZW ジンバブエ
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	
EE エストニア	KZ カザフスタン	RU ロシア	
	LC セントルシア	SD スーダン	
		SE スウェーデン	

明細書

ヒトリゾホスファチジン酸受容体物質およびその用途

5

技術分野

本発明はリゾホスファチジン酸（LPA）受容体およびその用途に関する。さらに詳しく言えば、(1)ヒトLPA受容体、(2)ヒトLPA受容体蛋白質を用いるヒトLPA酸様物質、ヒトLPA拮抗物質、ヒトLPA受容体に反応するLPA以外のリン脂質に対する拮抗物質または作動物質のスクリーニング方法、(3)ヒトLPA受容体を含有するLPA阻害剤またはヒトLPA以外のリン脂質に対する阻害剤、(4)ヒトLPA受容体の製造方法、(5)ヒトLPA受容体のモノクローナルまたはポリクローナル抗体、(6)ヒトLPA受容体をコードするcDNA、(7)前記cDNAからなる複製または発現ベクター、および(8)前記複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

背景技術

LPA受容体はLPAと結合し、細胞内にシグナルを伝え、細胞増殖、血管細胞の脱分化、細胞の増殖抑制など、様々な生理現象を引き起こすことが知られている。従ってヒトLPA受容体を得ることができればそれ自体を利用して、血管スパズムなどの医薬品、診断薬として応用が期待できるばかりでなく、新しいタイプのLPA受容体拮抗剤などの医薬品のスクリーニングや評価など幅広く医薬品の開発に利用できることが予想される。LPA受容体は複数存在することが知られているが、ある種のLPA受容体についてはヒト型は未だ単離されておらず、その作用および構造は明確になっていない。

細胞は増殖因子、ホルモン、神経伝達物質などの生理活性物質を受容体を介して認識し、様々な応答する。細胞膜上に存在するLPA受

容体はL P Aと結合し、同受容体に共役したG蛋白質を介して細胞内にシグナルを伝える。L P A受容体に共役し得るG蛋白質としてはG i, G qなどが知られており、同受容体は細胞増殖亢進作用、また逆の増殖抑制作用などの応答に関与するとされる。さらに、G蛋白質
5 の下流にはM A P - キナーゼ系が連動しており、L P A受容体は多彩なシグナルを伝達することが分かってきた。

L P Aをリガンドとする受容体は既にマウスやアフリカツメガエルから単離されている。例えば、T i g y iらはL P A受容体をアフリカツメガエルの卵母細胞より最初に得ており、これはP S P 2 4型
10 L P A受容体と称されている (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 14367-14372, 1996)。また、マウスより別のタイプのL P A受容体がクローニングされており、これはv z g - 1と称されている (J. Cell. Biol. 135, 1071-1083, 1996)。

ヒト由来L P A受容体についてはv z g - 1のホモログである
15 E d g - 2 (Biochem. Bioph. Res. Commun., 231, 619-622, 1997)が報告されているが、P S P 2 4型についてのヒトでの報告はない。

発明の概要

本発明者はアフリカツメガエルの卵母細胞に発現するP S P 2 4型
20 L P A受容体のヒトでのカウンターパートをクローン化することを目的として鋭意検討を重ねた結果、ヒト由来脳組織からP S P 2 4型ヒトL P A受容体をコードするc D N Aのクローン化および当該L P A受容体の全アミノ酸配列の決定に成功した。

核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対して
25 B L A S T Nにより、またアミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対してB L A S T Pにより検索した結果、P S P 2 4型ヒトL P A受容体をコードする核酸配列と一致する配列はなかった。また、疎水性プロットによる解析から、当

該LPA受容体のポリペプチドは7回膜貫通領域を持つことが予想された。このことから、当該ポリペプチドは、新規の膜蛋白質であることが判明した。

本発明は、

- 5 (1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列、そのホモログ、フラグメントまたはそのホモログのフラグメントからなる蛋白質、
- (2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列またはそのホモログからなるヒトリゾホスファチジン酸(ヒトLPA)受容体、
- (3) 前記1または2に記載の蛋白質を用いることを特徴とするヒト
- 10 LPA酸様物質、ヒトLPA拮抗物質、ヒトLPA受容体に反応するLPA以外のリン脂質に対する拮抗物質または作動物質のスクリーニング方法、
- (4) 前記1または2に記載の蛋白質を有効成分として含有するヒトLPA酸阻害剤、またはヒトLPA以外のリン脂質に対する阻害剤、
- 15 (5) 前記1または2に記載の蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された細胞を培養し、培養物から当該蛋白質を採取することからなるヒトLPA受容体の製造方法、
- (6) 前記1または2に記載の蛋白質あるいはその蛋白質の部分配列からなるペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体、
- 20 (7) 前記1または2に記載のポリペプチドをコードするcDNA、
- (8) 配列番号2に記載の塩基配列を有する前記7記載のcDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメント、
- (9) 配列番号3に記載の塩基配列を有する前記7記載のcDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメント、
- 25 (10) 前記6から9のいずれかの項に記載のcDNAからなる複製または発現ベクター、および
- (11) 前記10記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明ヒト L P A 受容体の C H O 細胞での発現のノザンハイブリダイゼーションの結果を示す。

5

詳細な説明

本発明は、実質的に純粋な形である配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、その配列のフラグメントおよびそのホモログに関する。

本発明はさらにそれらのポリペプチドをコードする c D N A に関する。より具体的には、配列番号 2 で示される塩基配列に関する。

ハイブリダイズする c D N A には、上記配列の相補配列も含まれる。

ハイブリダイズさせるための条件は、ストリンジェントであることが好ましい。

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのホモ
15 ログとは、一般に少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個、例えば 40、60 または 100 個の連続したアミノ酸領域で、少なくとも 70 %、好ましくは少なくとも 80 または 90 %、より好ましくは 95 % 以上相同性であるものであり、そのようなホモログは、以後本発明のポリペプチドとして記載される。

20 さらに、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのフラグメント、またはそれらのホモログのフラグメントとは、少なくとも 10 アミノ酸、好ましくは少なくとも 15 アミノ酸、例えば 20、25、30、40、50 または 60 アミノ酸部分を意味する。

配列番号 2 または 3 で示される塩基配列を有する c D N A に選択的
25 にハイブリダイズする c D N A とは、一般に、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個、例えば 40、60 または 100 個の連続した塩基配列領域で、少なくとも 70 %、好ましくは少なくとも 80 または 90 %、より好ましくは 95 % 以上相同性であるものであり、

そのような cDNA は、以後本発明の cDNA として記載される。

配列番号 2 で示される塩基配列を有する cDNA のフラグメントとは、少なくとも 10 塩基、好ましくは少なくとも 15 塩基、例えば 20、25、30 または 40 塩基部分を意味し、そのようなフラグメントも本発明の cDNA に含まれる。

さらに、本発明には、本発明のポリペプチドを発現させるための条件下で、本発明の宿主細胞を培養することからなる本発明のポリペプチドの製造方法も含まれる。培養は、本発明のポリペプチドが発現し、宿主細胞より製造される条件下で行なわれることが好ましい。

10 本発明の cDNA は、上記のようなベクターのアンチセンス領域に挿入することでアンチセンス mRNA を製造することもできる。このようなアンチセンス mRNA は、細胞中の本発明のポリペプチドのレベルを制御することに用いることもできる。

本発明は、本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体も含む。さらに本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造方法も含む。モノクローナル抗体は、本発明のペプチドまたは、その断片を抗原として用い、通常のハイブリドーマの技術により製造することができる。ポリクローナル抗体は、宿主動物（例えば、ラットやウサギ等）に本発明のポリペプチドを接種し、免疫血清を回収する、通常の方法により製造することができる。

本発明には、本発明のポリペプチド、その抗体と薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有する薬学的組成物も含まれる。

本発明のポリペプチドとしては、配列番号 1 アミノ酸配列を有するもの以外に、その一部が欠損したもの（例えば、配列番号 1 中、生物活性の発現に必須な部分だけからなるポリペプチド等）、その一部が他のアミノ酸と置換したもの（例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの）、およびその一部に他のアミノ酸が付加または挿入されたも

のも含まれる。

よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは1～6種類（例えば、Metは1種類、Leuは6種類）知られている。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくcDNAの塩

5 基配列を変えることができる。

本発明のcDNAには、配列番号1で示されるポリペプチドをコードするすべての塩基配列群が含まれる。塩基配列を変えることによって、ポリペプチドの生産性が向上することがある。

配列番号2で特定されるcDNAは、本発明のcDNAの一態様であり、天然型配列を表わす。

配列番号3で示されるcDNAは、配列番号2で特定されるcDNAに天然の非翻訳部分を加えた配列を示す。

配列番号2または3中に示される塩基配列を有するcDNAの作製は、例えば以下の方法に従って行なわれる。

15 ヒトLPA受容体のcDNAクローニング

一般的にはヒト成人脳組織、ヒト腎組織などからまた、種々のヒト細胞株などよりTRIzol reagent（登録商標、GIBCOBRLより販売）を用いて全RNAを抽出し、mRNA・プュリィフィケーション・キット（mRNA Purification Kit）（商品名、Pharmaciaより販売）などを用いてpoly(A)⁺ RNAを精製することができる。ガブラーらの方法（Gene, 25, 263, 1983）または市販のcDNA合成キットを用いてcDNAを作製し、必要に応じて長塩基対のものを分別した後、プラスミドベクター（例えばPUC19）やλファージベクター（例えば、λgt11）に導入することができる。

25 このようにして作製されたcDNAライブラリーから常法に準じて、標識プローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーションなどでスクリーニングし、PSP24型ヒトLPA受容体の全部またはその一部を含むcDNA断片を含むクローン

- を選別することができる。さらに必要に応じて当該cDNAを他のベクターなどに再クローニングすることによりPSP24型ヒトLPA受容体cDNAを単離することができる。またこれとは全く別の方法として、上記にてcDNAを作製し、アフリカツメガエルより単離されたcDNA配列をもとにプライマーを作製し、PCR法によりPSP24型ヒトLPA受容体cDNAの部分長をクローニングし、さらにこれを利用して全長のクローニングを行なうことができる。

発明を実施するための最良の形態

- 10 以下に本発明の実施例を挙げて具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

実施例1：poly(A)⁺RNAおよびcDNAの調製

- ヒト成人脳組織よりTRIzol reagent（登録商標、GIBCOBRLより販売）を用いて全RNAを抽出し、mRNA Purification Kit（商品名、Pharmaciaより販売）を用いてpoly(A)⁺RNAを精製した。

このpoly(A)⁺RNAをもとにマラソン・cDNA・アンプリフィケーション（Marathon cDNA Amplification Kit）（商品名、Clontech社より販売）によりcDNA合成を行なった。

20

実施例2：PSP24型ヒトLPA受容体の部分クローニング

- アフリカツメガエルの卵母細胞より得られたLPA受容体（PSP24）の塩基配列の情報に基づいて、センス、アンチセンスそれぞれ18個ずつのプライマーを作製し、このプライマー間でPCRを行なった。そのうち、あるプライマーの組み合わせでヒトPSP24型クローンの部分断片と思われるバンドが増幅された。このPCRに用いたプライマーのセットを以下に示す。

アフリカツメガエルPSP24プライマー#15：5' - TTCCCT

TATTATTGTACAGAGGCAGG-3' (25mer) (配列番号4)、アフリカツメガエルPSP24プライマー#21:5'-AAGAGAATCAAAATAGTGGTGAAGG-3' (25mer) (配列番号5)。

- 5 増幅されたcDNAをアガロース電気泳動で分画後、pT7Blue-2 T-Vector (商品名、Novagenより販売)に連結し、大腸菌DH5aに形質転換してプラスミドを調製した。そして、このDNAの全塩基配列を決定した。決定した塩基配列を核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対してBLASTNにより、また決定した塩基配列を翻訳したアミノ酸配列をアミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対してBLASTPにより
- 10 検索した結果、アフリカツメガエルPSP24型LPA受容体と相同性を示し、かつ決定したDNAの核酸配列およびアミノ酸配列と一致する配列はなかった。このことからこのPCR産物は新規の遺伝子の
- 15 部分長であることが判明した。

実施例3：ヒトPSP24型LPA受容体の全長クローニング

- 次にマラソンcDNAアンプリケーション (Marathon cDNA Amplification kit (商品名、Clontech社より販売))を用いて全長クローニングを試みた。決定した部分長の塩基配列内に新たにプライマーを作製し (F1, F2, F3, R1, R2およびR3)、このプライマーと5'側あるいは3'側のアダプター配列特異的プライマー (AP1, AP2)間で5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)および3'-RACEを行なった。そのうち以下のプライマーの
- 20 組み合わせでヒトPSP24型LPA受容体クローンの5'部分あるいは3'部分と思われるバンドが増幅された。このPCRに用いたプライマーのセットを以下に示す。
- 25

<u>5' - RACE</u>	
<u>1 s t P C R</u>	<u>Nested P C R</u>
R 1 - A P 1	R 2 - A P 2
5 R 2 - A P 1	R 3 - A P 2
R 3 - A P 1	R 3 - A P 2

<u>3' - RACE</u>	
<u>1 s t P C R</u>	<u>Nested P C R</u>
10 1 - A P 1	F 2 - A P 2
2 - A P 1	F 3 - A P 2

R 1 プライマー :

5' - G C C C A T G T C A A T G C T C A T C T G G A A A G G
 15 - 3' (2 7 m e r) (配 列 番 号 6)、

R 2 プライマー :

5' - A G G T C T C T G C A G A C T C A T G A G A C C C A G
 - 3' (2 7 m e r) (配 列 番 号 7)、

R 3 プライマー :

20 5' - G C T G G C C T G G C T G A G G C A T A T A C C T T C
 - 3' (2 7 m e r) (配 列 番 号 8)、

F 1 プライマー :

5' - G T C C A G A G G C A G G A T A A G C T A A A C C C A
 - 3' (2 7 m e r) (配 列 番 号 9)、

25 F 2 プライマー :

5' - C C G A C C T G C A G A T A C C T T C C C G A G C T C
 - 3' (2 7 m e r) (配 列 番 号 1 0)、

F 3 プライマー :

5' - ACCAATCCAGGCTACCAGGCTTATGTG
- 3' (27mer) (配列番号 11)

AP 1 プライマー :

5 5' - CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC
- 3' (27mer) (配列番号 12) :

AP 2 プライマー :

5' - ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC - 3'
(23mer) (配列番号 13)。

- 10 増幅された cDNA を部分クローニングと同様の手法でサブクロー
ニングし、全塩基配列を決定し、配列番号 3 に示す配列を得た。さら
にオープンリーディングフレームを決定し、アミノ酸に翻訳して配列
番号 1 に示す配列を得た。核酸配列データベースに登録されている既
知の核酸配列に対して BLASTN により、またアミノ酸配列データ
15 ベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対して
BLASTP により検索した結果、本発明のポリペプチド、PSP
24 型ヒト LPA 受容体をコードする核酸配列と一致する配列はなか
った。このことから、本発明のポリペプチドは新規の膜蛋白質である
ことが判明した。また同類の 7 回膜貫通領域を持つ膜蛋白質である P
20 AF 受容体、LTB4 受容体などとのホモロジーもなかったことから、
本クローンはアフリカツメガエルの PSP 24 LPA 受容体のヒトで
のカウンターパートである可能性が示唆された。

実施例 4 : 全長 cDNA のクローニングおよび塩基配列の決定

- 25 全長 cDNA のクローニングは配列番号 3 に示す決定された PSP
24 型ヒト LPA 受容体の塩基配列をもとに Kozac 配列と全翻訳
領域を含む様にプライマーを作製し、PCR 法によりクローニングし
た。用いたプライマーは次の 2 種である。

5'側プライマー:

5' - AAACCATGGTCTTCTCGGCAGTGTGTA
- 3' (27mer) (配列番号14),

3'側プライマー:

5' - TCACACCAACCGTCCGATGTTCCCCACA
- 3' (27mer) (配列番号15)。

特異的に増幅されたcDNAを、部分クローニングと同様の手法でサブクローニングし、全塩基配列を決定し、配列番号1に示す配列を得た。さらにオープンリーディングフレームを決定し、全長を単離した。

実施例5: 哺乳動物細胞でのタンパク発現

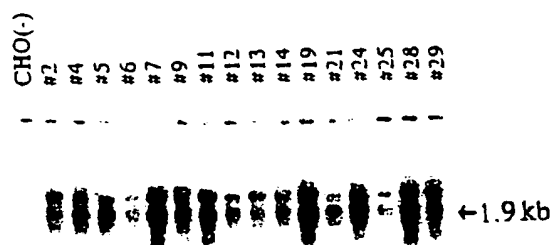
本発明受容体 (ヒトPSP24型LPA受容体) をCHO細胞に、リポフェクション法を用いて導入し、安定形質発現細胞を取得した。受容体発現を最大にするために、該遺伝子をプラスチジン (Blasticidin) 耐性マーカーを持つベクターに組み込み、制限酵素切断により、直鎖状にした後、細胞に導入した。次にプラスチジン (Blasticidin) (5 μ g/ml) 存在下で培養し、耐性株を限外希釈法により29個単離した。これらのクローンからTRIzol試薬 (Gibco BRL) を用いて全RNAを調製し、RT-PCRにより発現しているクローンのみを選択した。発現が確認されたクローンについて、該遺伝子の全長をプローブとして、ノザンハイブリダイゼーション (Northern Hybridization) 法により、発現量の強弱を測定した (図1)。図の右横に示した数字は、サイズマーカーとして用いたリポゾーマル RNAの大きさを示しており、1.9kb付近に該遺伝子の転写物と考えられるバンドが観察された。左端にコントロールとして親株のCHO細胞から調製した全RNAを泳動した。

請求の範囲

1. 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列、そのホモログ、フラグメン
5 トまたはそのホモログのフラグメントからなる蛋白質。
2. 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列またはそのホモログからなる
ヒトリゾホスファチジン酸（ヒト L P A）受容体。
- 10 3. 請求の範囲 1 または 2 に記載の蛋白質を用いることを特徴とする
ヒト L P A 酸様物質、ヒト L P A 拮抗物質、ヒト L P A 受容体に反応
する L P A 以外のリン脂質に対する拮抗物質または作動物質のスクリ
ーニング方法。
- 15 4. 請求の範囲 1 または 2 に記載の蛋白質を有効成分として含有する
ヒト L P A 酸阻害剤、またはヒト L P A 以外のリン脂質に対する阻害
剤。
- 20 5. 請求の範囲 1 または 2 に記載の蛋白質をコードする D N A を含む
発現ベクターで形質転換された細胞を培養し、培養物から当該蛋白質
を採取することからなるヒト L P A 受容体の製造方法。
- 25 6. 請求の範囲 1 または 2 に記載の蛋白質あるいはその蛋白質の部分
配列からなるペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体。
7. 請求の範囲 1 または 2 に記載のポリペプチドをコードする c D N
A。

8. 配列番号 2 に記載の塩基配列を有する請求の範囲 7 記載の c D N A、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメント。
9. 配列番号 3 に記載の塩基配列を有する請求の範囲 7 記載の c D N A、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメント。
10. 請求の範囲 6 から 9 のいずれかの項に記載の c D N A からなる複製または発現ベクター。
- 10 11. 請求の範囲 10 記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

第 1 図



受容体過剰発現細胞の発現チェック
(ノーザンハイブリダイゼーション)

配列表

Sequence Listing

<110> ONO Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Human Lysophosphatidic acid Receptor and use thereof

<130> ONF-2826PCT

<150> JP P1997-307749

<151> 1997-11-11

<160> 15

<210> 1

<211> 419

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Val Phe Ser Ala Val Leu Thr Ala Phe His Thr Gly Thr Ser Asn
 1 5 10 15

Thr Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Thr Tyr Met Asn Ile Thr Leu Pro
 20 25 30

Pro Pro Phe Gln His Pro Asp Leu Ser Pro Leu Leu Arg Tyr Ser Phe
 35 40 45

Glu Thr Met Ala Pro Thr Gly Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Ser Thr
 50 55 60

Ala Val Pro Thr Thr Pro Ala Ala Phe Lys Ser Leu Asn Leu Pro Leu
 65 70 75 80

Gln Ile Thr Leu Ser Ala Ile Met Ile Phe Ile Leu Phe Val Ser Phe
 85 90 95

Leu Gly Asn Leu Val Val Cys Leu Met Val Tyr Gln Lys Ala Ala Met
100 105 110

Arg Ser Ala Ile Asn Ile Leu Leu Ala Ser Leu Ala Phe Ala Asp Met
115 120 125

Leu Leu Ala Val Leu Asn Met Pro Phe Ala Leu Val Thr Ile Leu Thr
130 135 140

Thr Arg Trp Ile Phe Gly Lys Phe Phe Cys Arg Val Ser Ala Met Phe
145 150 155 160

Phe Trp Leu Phe Val Ile Glu Gly Val Ala Ile Leu Leu Ile Ile Ser
165 170 175

Ile Asp Arg Phe Leu Ile Ile Val Gln Arg Gln Asp Lys Leu Asn Pro
180 185 190

Tyr Arg Ala Lys Val Leu Ile Ala Val Ser Trp Ala Thr Ser Phe Cys
195 200 205

Val Ala Phe Pro Leu Ala Val Gly Asn Pro Asp Leu Gln Ile Pro Ser
210 215 220

Arg Ala Pro Gln Cys Val Phe Gly Tyr Thr Thr Asn Pro Gly Tyr Gln
225 230 235 240

Ala Tyr Val Ile Leu Ile Ser Leu Ile Ser Phe Phe Ile Pro Phe Leu
245 250 255

Val Ile Leu Tyr Ser Phe Met Gly Ile Leu Asn Thr Leu Arg His Asn
260 265 270

Ala Leu Arg Ile His Ser Tyr Pro Glu Gly Ile Cys Leu Ser Gln Ala
275 280 285

Ser Lys Leu Gly Leu Met Ser Leu Gln Arg Pro Phe Gln Met Ser Ile
290 295 300

Asp Met Gly Phe Lys Thr Arg Ala Phe Thr Thr Ile Leu Ile Leu Phe
 305 310 315 320

Ala Val Phe Ile Val Cys Trp Ala Pro Phe Thr Thr Tyr Ser Leu Val
 325 330 335

Ala Thr Phe Ser Lys His Phe Tyr Tyr Gln His Asn Phe Phe Glu Ile
 340 345 350

Ser Thr Trp Leu Leu Trp Leu Cys Tyr Leu Lys Ser Ala Leu Asn Pro
 355 360 365

Leu Ile Tyr Tyr Trp Arg Ile Lys Lys Phe His Asp Ala Cys Leu Asp
 370 375 380

Met Met Pro Lys Ser Phe Lys Phe Leu Pro Gln Leu Pro Gly His Thr
 385 390 395 400

Lys Arg Arg Ile Arg Pro Ser Ala Val Tyr Val Cys Gly Glu His Arg
 405 410 415

Thr Val Val

<210> 2
 <211> 1257
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 atggctctct cggcagtggt gactgcgttc cataccggga catccaacac aacattgtc 60
 ggtatgaaa acacclacat gaattatata cccccccac catccagca tctgacctc 120
 agtccattgc ttgatatag ttgtgaaacc atggctccca ctggtttgag ttcttgacc 180
 gigaatagta cagctgtgcc cacaacacca gcagcatlta agagcctaaa ctgacctct 240
 cagatcacc tttctgctat aatgatattc attctgtttg tgtctttct tgggaacttg 300

gttgtttgcc tcatggttta ccaaaaagct gccatgaggt ctgcaattaa calccctcct 360
gccagcctag cttttgcaga calgttgctt gcagtgctga acatgccctt tgccttggtt 420
actattctta ctacccgatg gatttttggg aaattcttct gtagggtatc tgcatagttt 480
ttctggttat ttgtgataga aggagtagcc atccgtctca tcattagcat agataggttc 540
cttattatag tccagaggca ggataagcta aacctatata gagctaaggt tcgatgtgca 600
gtttcttggg caacttcctt ttgtgtagct tticctttag ccgtaggaaa ccccgaccig 660
cagatacctt cccgagctcc ccagtgtgtg ttgggtlaca caaccaatcc aggtaccag 720
gcttatgtga ttttgatttc tctcatttct ttcttcalac ccttcttggg aatactgtac 780
tcatttaagg gcatactcaa cacccttcgg cacaatgcct tgaggatcca tagctacctt 840
gaagglatat gccicagcca ggccagcaaa ctgggtctca tgagictgca gagaccttcc 900
cagatgagca ttgacatggg cttaaaaaca cgtgccttca ccactatltt gattctcttt 960
gctgtcttca ttgtctgtct ggccccattc accacttaca gccttgtggc aacattcagt 1020
aagcactltt actatcagca caactltttt gagattagca cctggctact gtggctctgc 1080
tacctcaagt ctgcatigaa tccgtgtatc tactactgga ggattaagaa attccatgat 1140
gcttgccctg acatgatgcc taagtccttc aagtttttgc cgcagctccc tggtcacaca 1200
aagcgacgga tacgtcctag tgcgtctat gtgtgtgggg aacatcggac ggtgggtg 1257

<210> 3

<211> 1892

<212> DNA

<213> Homo sapiens

ctc aac acc ctt cgg cac aat gcc ttg agg atc cat agc tac cct gaa 1050
 Leu Asn Thr Leu Arg His Asn Ala Leu Arg Ile His Ser Tyr Pro Glu
 270 275 280

ggt ata tgc ctc agc cag gcc agc aaa ctg ggt ctc atg agt ctg cag 1098
 Gly Ile Cys Leu Ser Gln Ala Ser Lys Leu Gly Leu Met Ser Leu Gln
 285 290 295

aga cct ttc cag atg agc att gac atg ggc ttt aaa aca cgt gcc ttc 1146
 Arg Pro Phe Gln Met Ser Ile Asp Met Gly Phe Lys Thr Arg Ala Phe
 300 305 310

acc act att ttg att ctc ttt gct gtc ttc att gtc tgc tgg gcc cca 1194
 Thr Thr Ile Leu Ile Leu Phe Ala Val Phe Ile Val Cys Trp Ala Pro
 315 320 325

ttc acc act tac agc ctt gig gca aca ttc agt aag cac ttt tac tat 1242
 Phe Thr Thr Tyr Ser Leu Val Ala Thr Phe Ser Lys His Phe Tyr Tyr
 330 335 340 345

cag cac aac ttt ttt gag att agc acc tgg cta ctg tgg ctc tgc tac 1290
 Gln His Asn Phe Phe Glu Ile Ser Thr Trp Leu Leu Trp Leu Cys Tyr
 350 355 360

ctc aag tct gca ttg aat ccg ctg atc tac tac tgg agg att aag aaa 1338
 Leu Lys Ser Ala Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Tyr Trp Arg Ile Lys Lys
 365 370 375

ttc cat gat gct tgc ctg gac atg atg cct aag tcc ttc aag ttt ttg 1386
 Phe His Asp Ala Cys Leu Asp Met Met Pro Lys Ser Phe Lys Phe Leu
 380 385 390

ccg cag ctc cct ggt cac aca aag cga cgg ala cgt cct agt gct gtc 1434
 Pro Gln Leu Pro Gly His Thr Lys Arg Arg Ile Arg Pro Ser Ala Val
 395 400 405

tat gtg tgt ggg gaa cat cgg acg gtg gtg tgaatatgg aactggctga 1484
 Tyr Val Cys Gly Glu His Arg Thr Val Val
 410 415

callttgggt gatgcttgtt ctttatlgac atlgaattct ctltctcata gccctccac 1544
 ttatttttt ttatatagggt ttgtgtatgt atgtgtgtga gcagtgtaa gaaagaatgg 1604
 taattatagi tctgttacca agaataaata ataggaaagt gattacaaat attacctcca 1664
 gggttcaata gaaatccica atttaggggt aggagacttt ttttgggtt tggggtttt 1724
 ccttgatga tttgttttc atagtgggaa tcaggatgt gctttatga gccctcagtt 1784
 acattgaatt gtaggtgttt cgtgtgtgtc taaggatgc ttattttagt ttatcaagac 1844
 ttttttttt ctggaagaca ctgtgtcttt taccatcaca ttggagcc 1892

<210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Xenopus laevis

<220>
 <223> PSP24 primer #15

<400> 4
 ttctttatta ttgtacagag gcagg

25

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Xenopus laevis

<220>
 <223> PSP24 primer #21

<400> 5
 aagagaatca aaatagtggt gaagg

25

<220>

<221> CDS

<222> (208).. (1464)

<400> 3

tggagccatg ctccttgggc tcttccgcgg gcgcccgcgc gctgcccttc gctttaggca 60

aaaggacict tgggaagat ggaaticatt gtccatttcc cagaatgat ttccaagccc 120

atcaatggga ccgatactg ctgtctgtg ttgaaatgct tgaagaacac ctgcatctct 180

gcttgcactt tccatcctac tgaacc atg gtc ttc tcg gca gtg ttg act gcg 234

Met Val Phe Ser Ala Val Leu Thr Ala

1

5

ttc cat acc ggg aca tcc aac aca aca ttt gtc gtg tat gaa aac acc 282

Phe His Thr Gly Thr Ser Asn Thr Thr Phe Val Val Tyr Glu Asn Thr

10

15

20

25

tac atg aat att aca ctc cct cca cca ttc cag cat cct gac ctc agt 330

Tyr Met Asn Ile Thr Leu Pro Pro Pro Phe Gln His Pro Asp Leu Ser

30

35

40

cca ttg ctt aga tat agt ttt gaa acc atg gct ccc act ggt ttg agt 378

Pro Leu Leu Arg Tyr Ser Phe Glu Thr Met Ala Pro Thr Gly Leu Ser

45

50

55-

tcc ttg acc gtg aat agt aca gct gtg ccc aca aca cca gca gca ttt 426

Ser Leu Thr Val Asn Ser Thr Ala Val Pro Thr Thr Pro Ala Ala Phe

60

65

70

aag agc cta aac ttg cct ctt cag atc acc ctt tct gct ata atg ata 474

Lys Ser Leu Asn Leu Pro Leu Gln Ile Thr Leu Ser Ala Ile Met Ile

75

80

85

ttc att ctg ttt gtg tct ttt ctt ggg aac ttg gtt gtt tgc ctc atg 522

Phe Ile Leu Phe Val Ser Phe Leu Gly Asn Leu Val Val Cys Leu Met

90

95

100

105

```

gtt tac caa aaa gct gcc atg agg tct gca att aac atc ctc ctt gcc 570
Val Tyr Gln Lys Ala Ala Met Arg Ser Ala Ile Asn Ile Leu Leu Ala
          110          115          120

agc cta gct ttt gca gac atg ttg ctt gca gtg ctg aac atg ccc ttt 618
Ser Leu Ala Phe Ala Asp Met Leu Leu Ala Val Leu Asn Met Pro Phe
          125          130          135

gcc ctg gta act att ctt act acc cga tgg att ttt ggg aaa ttc ttc 666
Ala Leu Val Thr Ile Leu Thr Thr Arg Trp Ile Phe Gly Lys Phe Phe
          140          145          150

tgt agg gta tct gct atg ttt ttc tgg tta ttt gtg ata gaa gga gta 714
Cys Arg Val Ser Ala Met Phe Phe Trp Leu Phe Val Ile Glu Gly Val
          155          160          165

gcc atc ctg ctc atc att agc ata gat agg ttc ctt att ata gtc cag 762
Ala Ile Leu Leu Ile Ile Ser Ile Asp Arg Phe Leu Ile Ile Val Gln
          170          175          180          185

agg cag gat aag cta aac cca tat aga gct aag gtt ctg att gca gtt 810
Arg Gln Asp Lys Leu Asn Pro Tyr Arg Ala Lys Val Leu Ile Ala Val
          190          195          200

tct tgg gca act tcc ttt tgt gta gct ttt cct tta gcc gla gga aac 858
Ser Trp Ala Thr Ser Phe Cys Val Ala Phe Pro Leu Ala Val Gly Asn
          205          210          215

ccc gac ctg cag ata cct tcc cga gct ccc cag tgt gtg ttt ggg tac 906
Pro Asp Leu Gln Ile Pro Ser Arg Ala Pro Gln Cys Val Phe Gly Tyr
          220          225          230

aca acc aat cca ggc tac cag gct tat gtg att ttg att tct ctc att 954
Thr Thr Asn Pro Gly Tyr Gln Ala Tyr Val Ile Leu Ile Ser Leu Ile
          235          240          245

tct ttc ttc ata ccc ttc ctg gta ata ctg tac tca ttt atg ggc ata 1002
Ser Phe Phe Ile Pro Phe Leu Val Ile Leu Tyr Ser Phe Met Gly Ile
          250          255          260          265

```


<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:R1 primer

<400> 6
gcccatgca atgctcatct ggaaagg

27

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:R2 primer

<400> 7
aggctctcgc agatcatga gaccag

27

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:R3 primer

<400> 8
gctggcctgg ctgaggcata taccttc

27

<210> 9
<211> 27
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:F1 primer

<400> 9

gtccagaggc aggataagct aaaccca

27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:F2 primer

<400> 10

ccgacctgca gatacttcc cgagctc

27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:F3 primer

<400> 11

accaatccag gctaccaggc ttatgtg

27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> 5' Race adaptor primer:AP1 primer

<400> 12
ccaicctaatacgcactcactatagggc

27

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> Unknown

<220>
<223> 3' Race adaptor primer:AP1 primer

<400> 13
actcactatagggcicgagcggc

23

<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:5' end primer coding kozac sequence and all transcription region of PSP24 type human lysophosphatidic acid receptor

<400> 14
aaaccaatggctctctcggcagtgtga

27

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:3' end primer coding kozac sequence and all transcription region of PSP24 type human lysophosphatidic acid receptor

<400> 15

tcacaccacc giccgaigti cccacaca

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/705, C07K16/28, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/705, C07K16/28, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/EMBL (geneseq)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 93 (1996) Z. Guo et al., "Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor-like lipid mediator lysophosphatidic acid from <i>Xenopus</i> oocytes", p.14367-14372	1-11
Y	R.W. Ould, S.B. Primrose, "Principles of Gene Manipulation (in Japanese)", 25 February, 1991, K.K. Baifukan, p.115	1-11
P, Y	Neuroscience Res., Suppl. 22 (October, 1998) Y. Kawasaki et al., "Cloning and characterization of mouse LPA receptor (PSP24)", p.S89	1-11
P, Y	FASEB J., Vol. 12 (April, 1998) Y. Kawasaki et al., "Cloning and characterization of a mouse homologue of <i>Xenopus</i> PSP24 LPA receptor", p.A1460	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search
 27 January, 1999 (27. 01. 99)

 Date of mailing of the international search report
 9 February, 1999 (09. 02. 99)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/705, C07K16/28, C12N5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/705, C07K16/28, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GenBank/EMBL(geneseq)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 93(1996) Z. Guo et al.; "Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor-like lipid mediator lysophosphatidic acid from <u>Xenopus</u> oocytes", p. 14367-14372	1-11
Y	R. W. オールド, S. B. プリムローズ著「遺伝子操作の原理」 (25. 2月. 1991) (桐蔭風館, p. 115	1-11
P, Y	Neuroscience Res., Suppl. 22(10月. 1998) Y. Kawasaki et al.; "Cloning and characterization of mouse LPA receptor(PSP24)" , p. S89	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 01. 99

国際調査報告の発送日

09.02.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

印

4 B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, Y	FASEB J., Vol. 12 (4月, 1998) Y. Kawasaki et al. ; "Cloning and characterization of a mouse homologue of <u>Xenopus</u> PSP24 LPA receptor", p. A1460	1-11

